






**Extracts of shark cartilage having an anti-angiogenic activity and an effect on tumor regression; process of making thereof**

**Patent number:** JP9512563T  
**Publication date:** 1997-12-16  
**Inventor:**  
**Applicant:**  
**Classification:**  
**- International:** A61K35/60; A61K33/06; A61K33/14; A61K33/26;  
A61K33/30; A61K38/00  
**- european:** A61K35/60  
**Application number:** JP19950500104T 19950421  
**Priority number(s):** WO1995CA00233 19950421; US19940234019  
19940428; US19950384555 19950203

**Also published as:**

 WO9532722 (A1)  
 EP0759765 (A1)  
 US5618925 (A1)  
 F1964327 (A)  
 EP0759765 (B1)

more &gt;&gt;

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP9512563T

Abstract of corresponding document: **US5618925**

The present invention relates to shark cartilage extracts and to a method of producing the same, these extracts having anti-angiogenic properties (reduction of the area of blood vessels observed in vivo on experimentally induced tumors), tumor regressive activity in vivo as well as demonstrating a direct inhibitory effect on tumor cell lines. This process does not involve any denaturing solvent or product and does not involve the use of any enzymes. It consists of obtaining a blend of whole cartilage in an aqueous solution of neutral pH, preferably pure water, this blend being centrifuged and the pellet and supernatant kept for further processing. The pellet is lyophilized and tested for anti-tumor and anti-angiogenic activities in vivo and in vitro, with or without supernatant. The supernatant has been shown to have anti-angiogenic and tumor regressive activities in vivo. The composition of the supernatant has then been investigated by different ways. Fractionation of this supernatant led to the characterization of some of its active components. The fractions were tested for their direct in vitro activity on cancer cell lines. Therefore, it is assumed that the non-fractionated supernatant has such an in vitro activity. Lyophilization substantially destroys the activity of these liquid fractions while no such abolition is observed in the solid extract.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-512563

(43) 公表日 平成9年(1997)12月16日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 35/60	A D U	9283-4 C	A 6 1 K 35/60 A D U
// A 6 1 K 33/06		9284-4 C	33/06
33/14		9284-4 C	33/14
33/26		9284-4 C	33/26
33/30		9284-4 C	33/30
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全53頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平8-500104  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)4月21日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)10月28日  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA95/00233  
 (87) 国際公開番号 W095/32722  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)12月7日  
 (31) 優先権主張番号 08/234, 019  
 (32) 優先日 1994年4月28日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 08/384, 555  
 (32) 優先日 1995年2月3日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 レ ラボラトワール エテルナ インコーポレイティド  
 カナダ国, ケベック ジー1エヌ 4エー8,  
 ケベック, パール ジャン-タロン, マル  
 コーニ ストリート 456  
 (72) 発明者 デュボン, エリク  
 カナダ国, ケベック ジー0エヌ 2ゼット  
 0, サンニコラ, ドゥ ラ プレスクイ  
 ル, 141  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗脈管形成活性及び腫瘍退行に対する作用を有するサメ軟骨の抽出物並びにその製法

## (57) 【要約】

本発明はサメ軟骨抽出物及びその製法に関し、これらの抽出物は抗脈管形成特性(実験的に誘導した腫瘍に対してインビボで観察される血管面積の縮小)、インビボ腫瘍退行活性を有し、しかも腫瘍細胞系に対し直接阻害作用を発揮する。この方法は任意の変性溶剤又は製品を含まず、そして任意の酵素の利用を含まない。これは、中性pHの水溶液、好ましくは純水中の全軟骨のブレンドを獲得し、このブレンドを遠心し、そしてそのペレット及び上清液を更なる処理のために保存することより成る。このペレットを凍結乾燥し、そして上清液と一緒に、又は単独で、インビボ及びインビトロで抗腫瘍及び抗脈管形成活性について試験する。この上清液はインビボで抗脈管形成及び腫瘍退行活性を有することが示された。この上清液の組成は様々な方法により調べた。この上清液の分画はその活性成分の一部の特性決定をもたらした。その画分を癌細胞系に対し、その直接的なインビトロ活性について試験した。従って、非分画上清液はかかるインビトロ活性をもたないことが推定された。凍結乾燥はこれら液体画分の活性を実質的に破壊し、一方、

固体抽出物ではかかる失活は認められなかった。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

1. サメの全軟骨の水性溶液の遠心分離の後に得られる凍結乾燥ペレットより成る固体抽出物であって、インビボ抗脈管形成活性、インビボ腫瘍サイズ退行活性及びインビトロ抗腫瘍活性を有し、正常細胞に対するインビトロ活性を有さない固体抽出物。

2. 以下を含む請求項1記載の固体抽出物：

脂質	7.35%
タンパク質	46.2%
ナトリウム	4.16mg/g
カリウム	2.64mg/g
カルシウム	114 mg/g
マグネシウム	1.49mg/g
亜鉛及び鉄	微量。

3. 前記抗脈管形成活性及び腫瘍サイズ退行活性が乳腺腫瘍において観察されるものである、請求項1記載の固体抽出物。

4. 前記乳腺腫瘍がDMBAによりラットにおいて実験的に誘導されたものである、請求項3記載の固体抽出物。

5. 前記腫瘍サイズ退行活性が、処置前の腫瘍サイズが直径0.6～0.9cm のときに、8～10週間の処置にわたって1日当り3～5 g/ラット体重Kgの用量率において前記ラットにガベージにより前記固体抽出物を投与した場合に10～15%の腫瘍サイズの縮小より成る、請求項4記載の固体抽出物。

6. 前記抗脈管形成活性が、前記腫瘍の中の血管面積の約55%の縮小より成る、請求項5記載の固体抽出物。

7. 前記抗腫瘍活性がホルモン依存性乳腺癌細胞系に対して観察されるものである、請求項1記載の固体抽出物。

8. 前記ホルモン依存性乳腺癌細胞系が MCF-7 及びZR75-1 細胞系より成る群から選ばれる、請求項7記載の固体抽出物。

9. 前記抗腫瘍活性が、前記腫瘍細胞を3日間培養細胞培地1ml当り50～100m

g の前記固体抽出物の存在下で増殖させたときに腫瘍細胞増殖を実質的に完全に阻害するものである、請求項8記載の固体抽出物。

10. 前記正常細胞がヒト培養線維芽細胞である、請求項1記載の固体抽出物。

11. サメの全軟骨の水性溶液の遠心分離の後に得られる上清液より成る液体抽出物であって、インビボ抗脈管形成活性、インビボ腫瘍サイズ退行活性及びインビトロ抗腫瘍活性を有し、正常細胞に対するインビトロ活性を有さない液体抽出物。

12. 以下を含む請求項1記載の固体抽出物：

脂質	0.10%
タンパク質	1.77%
水分	98.8%
ナトリウム	33.6mg/g
カリウム	39.2mg/g
カルシウム	2.0 mg/g
マグネシウム	1.1 mg/g
亜鉛及び鉄	微量。

13. 前記抗脈管形成活性及び腫瘍サイズ退行活性が乳腺腫瘍において観察されるものである、請求項11記載の液体抽出物。

14. 前記乳腺腫瘍がDMBAによりラットにおいて実験的に誘導されたものである、請求項13記載の液体抽出物。

15. 前記腫瘍サイズ退行活性が、処置前の腫瘍サイズが直径0.6～0.9cm のときに、8～10週間の処置にわたって1日当たり約5mgの

前記液体抽出タンパク質含有量/ラット体重Kgの用量率において前記ラットにガベージにより前記固体抽出物を投与した場合に約5%の腫瘍サイズの縮小より成る、請求項14記載の固体抽出物。

16. 前記抗脈管形成活性が、前記腫瘍の中の血管面積の縮小より成る、請求項15記載の固体抽出物。

17. 前記抗腫瘍活性がホルモン依存性乳腺癌細胞系に対して観察されるもので

ある、請求項11記載の固体抽出物。

18. 前記ホルモン依存性乳腺癌細胞系が MCF-7 及び ZR75-1 細胞系より成る群から選ばれる、請求項17記載の固体抽出物。

19. 前記正常細胞がヒト培養線維芽細胞である、請求項11記載の固体抽出物。

20. 1~10キロダルトン (KD)、10~30KD、30~100KD 及び 100~500KD の分子量を有する画分に分画されたものであり、この画分がそれぞれ149, 127, 114 及び64%の細胞増殖阻害率により反映されるようなZR75-1 細胞系に対する抗腫瘍活性を、その細胞系を3日間にわたり 1 mlの培養培地当たり400, 100, 100 及び 100  $\mu$  g の粗軟骨重量で表わされる対応の量の前記液体抽出物の存在下で増殖させたときに有するものである、請求項11記載の液体抽出物。

21. 1~2.5 キロダルトン (KD) の分子量を有する請求項11記載の液体抽出物の液体画分。

22. 29キロダルトン (KD) の分子量及び5.30~6.26の等電点を有する請求項11記載の液体抽出物の液体画分。

23. 35キロダルトン (KD) の分子量及び7.64~7.94の等電点を有する請求項11記載の液体抽出物の液体画分。

24. 48キロダルトン (KD) の分子量及び7.29~7.94の等電点を有する請求項11記載の液体抽出物の液体画分。

25. 60キロダルトン (KD) の分子量及び5.30~6.26の等電点を有

する請求項11記載の液体抽出物の液体画分。

26. 60~120 キロダルトン (KD) の分子量を有する請求項11記載の液体抽出物の液体抽出物。

27. 請求項1記載の固体抽出物の獲得のための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する、ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして 500  $\mu$  m未満の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離させる；そして

前記ペレットを凍結乾燥する；

を含んで成る方法。

28. 前記非変性水性溶液が純水である、請求項27記載の方法。

29. 請求項11記載の液体抽出物を獲得するための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する；ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして500 $\mu$ m未満の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離する；

前記上清液を濾過し、500KD より大きい分子量の分子を浸透させる；そして

0.22 $\mu$ mの孔のフィルターで前記浸透物を濾過する；

を含んで成る方法。

30. 前記非変性水性溶液が純水である、請求項29記載の方法。

31. 請求項21記載の液体画分の獲得のための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する

；ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして500 $\mu$ m未満の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離させる；

前記上清液を限外濾過にかけ、500KD未満の分子量の分子を浸透させる；

0.22 $\mu$ mの孔のフィルターで前記浸透物を濾過する；そして

クロマトグラフィーにより前記浸透物から1～2.5KD の前記液体画分を単離する；

を含んで成る方法。

32. 請求項22記載の液体画分の獲得のための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する；ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして500 $\mu$ m未満

の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離させる；

前記上清液を限外濾過にかけ、500KD未満の分子量の分子を浸透させる；

0.22  $\mu$  mの孔のフィルターで前記浸透物を濾過する；そして

クロマトグラフィーにより前記浸透物から29KDの前記液体画分を単離する；

を含んで成る方法。

33. 請求項23記載の液体画分の獲得のための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する；ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして 500  $\mu$  m未満の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離させる；

前記上清液を限外濾過にかけ、500KD未満の分子量の分子を浸透させる；

0.22  $\mu$  mの孔のフィルターで前記浸透物を濾過する；そして

クロマトグラフィーにより前記浸透物から35KDの前記液体画分を単離する；

を含んで成る方法。

34. 請求項24記載の液体画分の獲得のための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する；ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして 500  $\mu$  m未満の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離させる；

前記上清液を限外濾過にかけ、500KD未満の分子量の分子を浸透させる；

0.22  $\mu$  mの孔のフィルターで前記浸透物を濾過する；そして

クロマトグラフィーにより前記浸透物から48KDの前記液体画分を単離する；

を含んで成る方法。

35. 請求項25記載の液体画分の獲得のための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する；ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして 500  $\mu$  m未満の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離させる；

前記上清液を限外濾過にかけ、500KD未満の分子量の分子を浸透させる；

0.22  $\mu$  mの孔のフィルターで前記浸透物を濾過する；そして

クロマトグラフィーにより前記浸透物から60KDの前記液体画分を単離する；  
を含んで成る方法。

36. 請求項26記載の液体画分の獲得のための方法であって、全て4℃で行う以下の段階：

中性pHの非変性水性溶液中のサメ軟骨由来のブレンドを獲得する；ここでこのブレンドはもっぱら機械的手段により得られるものであり、そして 500  $\mu$  m未満の粒子サイズを有する；

前記ブレンドを遠心分離し、ペレットを上清液から分離させる；

前記上清液を限外濾過にかけ、500KD未満の分子量の分子を浸透させる；

0.22  $\mu$  mの孔のフィルターで前記浸透物を濾過する；そして

クロマトグラフィーにより前記浸透物から60～120KD の前記液体画分を単離する；

を含んで成る方法。

37. 前記クロマトグラフィーをSephacryl S-300 又はSuperose S-12 精製カラムを用いてファスト・プロテイン・液体クロマトグラフィーで実施する、請求項31～36のいずれか1項記載の方法。

38. 前記クロマトグラフィー段階を、前記液体抽出物を別々の画分に分離する段階に置き換えた方法であって、この分離が前記画分の中に含まれる分子の等電点を基礎とし、前記液体画分の分子量を電気泳動ゲルで見積る、請求項32～35のいずれか1項記載の方法。



### 【発明の詳細な説明】

抗脈管形成活性及び腫瘍退行に対する作用を有するサメ軟骨の抽出物並びにその製法

#### 発明の背景

軟骨は無血管組織であり、そして抗脈管形成因子を含む潜在的な候補として研究されている。これは腫瘍の発達に対して比較的耐性な組織でもある。軟骨に関与する腫瘍である軟骨肉腫が唯一の固体腫瘍の血管化である。脈管形成は腫瘍の発達における重要な要因の一つである。腫瘍細胞がその栄養要求を補うために隣接の血管ネットワークを刺激して拡大しうるとき、独立の固体腫瘍塊が出現する。従って、脈管形成の刺激に関与する因子が腫瘍の発達におけるその役割について研究されており、そして抗脈管形成因子及び脈管形成阻害活性を有する薬剤も腫瘍の成長を調節又はその退行を及ぼすための手段として研究されている。

子牛の骨甲骨は固体腫瘍の脈管形成を阻害する物質を含むことが発見された (Langerら、1976)。その抗腫瘍剤としてのたくましい能力を理由に、軟骨のより良い供給源が探索されている。

サメは脈管形成インヒビターのこの種の潜在的な起源であり、その理由はその内骨格は全体的に軟骨より成るからである (その体重の6%、それに対し、子牛では0.6%)。サメは腫瘍が発達しにくいという興味深い特徴をも有する。サメのこの腫瘍が発育しにくい性質を説明するための数多くの仮説が立てられた。Marchalonisら (1990) は任意の攻撃的な因子を容易に攻撃することのできるIgM抗体を示した。McKinneyら (1990) はサメが、新生細胞から正常細胞を分化させ、且つその新生細胞を破壊することのできるマクロファ

ージを有することを示した。RosenとWoodhead (1980) は板鰓類 (サメ及びエイを含む群) の腫瘍のめずらしさはその組織の高イオン強度に基づきうるものと推定し、このことは高い体温と同じことである。このような条件において、これらの著者はその免疫系が100%に近い免疫学的監視を及ぼすものとして信じている。Mooreら (1993) は、サメが抗菌及び抗原生動物特性を有するアミノステロールを産生することを発見した。最後に、LeeとLanger (1983) 及びFolkmanと

Klagsbrun(1987)は新生血管形成を阻害する物質を産生することを示した。LeeとLanger(前掲)は、変性条件(グアニジン抽出)下でサメ軟骨からこの物質を抽出することにより、これを単離している。しかしながらこの抽出工程は非常に長く(41日)、そして変性因子を有する抽出物を生み出しうる。子牛から単離した活性物質は約16キロダルトン(Kd)の分子量を有するが、上記の研究者グループはサメにおいて回収されたものの正確な分子量は発表していない。この物質は3500ダルトンより大きい分子量を有するとしか定義されていない。Oikawaら(1990)はLeeとLangerにより述べられているものと同じ抽出方法を利用しているが、それははるかに短い時間である(41日ではなく、2日)。Oikawaらによりサメ軟骨から単離された物質は1,000~10,000ダルトンの範囲の分子量を有する。Schinitzky(USP第4,473,551号)は粗粉末化されたサメ軟骨の水抽出物を述べており、その100,000ダルトンより大きい画分は単独で、又はグルコサミンと組合さって抗炎症活性を有する。抗脈管形成又は抗腫瘍活性を有しているこの抽出物の成分についての示唆はこの特許の中ではなされていない。Kuetnerら(USP第4,746,729号)はウシ軟骨から多形核好中球(PMN)エラスターゼインヒビターを単離した。このインヒビターは、50,000ダルトンより大きい分子量の分子を抑制する軟骨の水性抽出から得られる。Seph

acryl S-200での分画は多くの画分をもたらし、そのうちの抗エラスターゼ活性を示した10~40KDのものを、プールした。その活性成分は9.5の等電点を有し、そして約15,000ダルトンの分子量を有しうる。Kuetnerら(USP第4,042,457号)は、ウシ軟骨が500,000ダルトン未満の分子量の成分を有し、それが内皮細胞増殖に対する活性を全くもたず、細胞増殖阻害活性を有することも示した。Spilburgら(USP第4,243,582号)はウシ軟骨から65KDの分子量及びpI3.8の2種類の糖タンパク質を単離し(グアニジン抽出)、これは抗トリプシン活性及び内皮細胞増殖阻害活性を示す。

子牛及びサメの軟骨は多くの生物活性、例えばリゾチーム活性、細胞増殖促進活性、更にはI型及びIV型コラゲナーゼ、エラスターゼ並びにトリプシン、ホモトリプシン及びプラスミンの如きのプロテアーゼに対する阻害活性を有する。

サメ軟骨抽出物及び画分を獲得する方法は既に公知である。そのいくつかは全く抽出なしで粉末化粗軟骨をもたらしており (USP 第 5, 075, 112号)、他の者はグアニジンのような変性剤を使用し (USP 第 4, 243, 582号)、又は軟骨の周囲の任意の筋肉、神経もしくは脈管構造を除去する酵素反応及び脂肪を排除するための有機溶剤を使用し (USP 第 3, 478, 146号、第 4, 350, 682号及び第 4, 656, 137号)、次いで軟骨の抽出しており、一方その他の者は単に不溶性物質を除去することによって軟骨の水溶性抽出物 (水中 (USP 第 4, 473, 551号) 又は塩溶液 (USP 第 4, 746, 729号)) を作っている。この後者のうち、特定の分子量の特定の画分が更なる研究及び精製のために特に保持されている (前述を参照のこと)。

まとめると、サメ軟骨はウサギ角膜ポケットアッセイ又はヒヨコ漿尿膜 (CAM) アッセイにおいて一般的に試験され、抗脈管形成成分を含むことが知られている。今日まで、全粉末化軟骨はその抗脈管

形成効果に関し、インビボで腫瘍に対して又はヌードマウスに移植されたヒトメラノーマ異種移植片 (USP 第 5, 075, 112号) に対して直接的に試験されており、更に CAM において試験されている。しかしながら、腫瘍細胞に対する軟骨抽出物の直接的な効果についての証拠はない。

脈管形成は癌の発達にのみかかわっているのではない。生理系 (かっこ内に表示) を冒す多くの病気又は症状は脈管形成依存性であり、特に以下がその例である。関節炎及びアテローム症プラーク (骨及び靱帯)、糖尿病網膜症、新生血管形成緑内障、トラコーマ及び角膜移植新生血管形成 (目)、乾癬、強皮症、血管腫及び過形成性瘢痕 (皮膚)、脈管接着及び血管線維腫 (血液系)。従って、任意の新規の抗脈管形成因子がこれらの病気の処置及び癌治療において有用でありうる。

#### 発明の記述

本発明は抗脈管形成特性 (実験的に誘導した腫瘍に基づくインビボで観察される血管面積の縮小) 及びインビボ腫瘍退行活性を有し、且つ腫瘍細胞系に及ぼす直接的な阻害作用を発揮する抽出物を生産する方法に関する。これらの抽出物は通称コモン・スピニー、ドッグ・フィッシュ (Common Spiny dog fish) 及びブラ

ック・スピニー・ドッグ・フィッシュ (Black Spiny dog fish スカラス・アカンチアス [Squalus acanthias]) のサメの軟骨に由来する。この方法は、変性溶剤又は製品を含まず、そして任意の酵素の利用を含まない。これは、中性pHの水溶性、好ましくは純水中の全軟骨のブレンドを獲得し、このブレンドを遠心分離し、そしてそのペレット及び上清液を更なる処理のために保存することより成る。ペレットを凍結乾燥し、そして上清液を伴って、又は伴わないで、インビ

ボ及びインビトロで抗腫瘍及び抗脈管形成活性について試験する。この上清液はインビボで抗脈管形成及び腫瘍退行活性を有することが示された。次いでこの上清液の組成を様々な方法により調べた。この上清液の分画はその活性成分の一部の特性決定をもたらした。これらの画分を癌細胞系に対するその直接インビトロ活性について試験した。従って、分画にかけていない上清液はかかるインビトロ活性を有するものと考えられる。凍結乾燥はこれらの画分の活性を実質的に破壊してしまい、従って固体及び液体抽出物とその画分との間にははっきりとした相違が生まれることを強調すべきである。

本発明は軟骨凍結乾燥品又は固体抽出物、液体軟骨抽出物及びその液体画分、並びにその全てを獲得するための方法にも関する。

最後に、本発明は脈管形成依存病の処置における軟骨抽出物の利用に関する。予備臨床試験は、脈管形成依存病に苦しむ患者の症状の改善における濃縮未分画液体抽出物を含む薬理組成物の薬効を示している。そのうち、乾癬の如くの皮膚障害及び前立腺癌の一例の試験が成功を収めている。脈管形成依存病とは立証されていない別の皮膚障害であるアクネも驚くべきことに有効に処置された。多大な新生血管形成は火傷を負った患者の過形成性瘢痕の認定された特徴である。本発明の軟骨抽出物を含む組成物はこの現象を予防するために現在試験されている。液体軟骨抽出物を活性成分として含む薬理組成物も本発明の対象である。

#### 図面の簡単な説明

本発明は以下の特定の態様により一層簡単に理解でき、その態様は、本発明を限定するのではなく、本発明に例示することを目的とする以下の図面により補足説明する：

図1はZR75-1及びMCF-7細胞に対する増大していく用量のサ

メ軟骨（固体抽出物）の阻害活性を示す。

図2はMCF-7細胞に対する定量的な用量-応答曲線を示し、それは2通りの濃度の軟骨凍結乾燥品を伴って又は伴わない増大していく濃度のエストラジオールの存在下でのその細胞のDNA含有量により測定した。

図3 a) 及び b) は、軟骨凍結乾燥品及び上清液の組合せをガベージ (gavage) により投与したものと、水のみを投与したものと、乳腺癌の発達したラットの肝臓切片の対比を示す。

図4 a) 及び b) は、軟骨凍結乾燥品及び上清液の組合せをガベージにより投与したものと、水のみを投与したものと、乳腺癌の発達したラットの腎臓切片の対比を示す。

図5 a) 及び b) は、軟骨凍結乾燥品及び上清液の組合せをガベージにより投与したものと、水のみを投与したものと、乳腺癌の発達したラットの肺切片の対比を示す。

図6 a) 及び b) は、軟骨凍結乾燥品及び上清液の組合せをガベージにより投与したものと、水のみを投与したものと、乳腺腫瘍の発達したラットの乳腺腫瘍切片の対比を示す。

図7は、腫瘍の中の血管に対する軟骨抽出物の作用を示す、図6 a) 及び 6 b) に由来する棒グラフである。

図8は、Rotofor で分離せしめた液体画分の非変性条件における電気泳動プロフィールを示す。左側に分子量マーカーがあり、次に単離画分との対比のための画分にかける前の粗浸透物のサンプルがくる。

図9 a) 及び 9 b) は、有効量の濃縮液体軟骨抽出物（下の写真）を含む局所組成物により処置したときの、一方は角質増殖症を有し (9a)、そして他方は角質増殖症を有さない (9b) 乾癬に苦しむ2人の患者の症状の、その初期症状（上の写真）と対比しての、著

しい改善を示す。

## 発明の説明

捕獲後、健康なブラック・スピニー・ドッグ・フィッシュ及びコモン・スピニー・ドッグ・フィッシュのサメから軟骨を獲得した。任意の筋肉及び接続組織はエタノール処理したスパチラ及びはさみによりかき落すことにより除去した。この軟骨を次いでプラスチック袋の中に真空包装し、そして更なる使用のために $-20^{\circ}\text{C}$ に凍結した。

## 凍結乾燥軟骨の調製

軟骨を $4^{\circ}\text{C}$ に融解した。次に軟骨を逆浸透及び $0.1\mu\text{m}$ のフィルターでの濾過により精製しておいた等量（重量／容量）の水と一緒にエタノール処理したミート・チョッパーの孔に3回通し、第1ブレンドを得た。軟骨成分の分解又は変性を回避するよう中性pHが保たれている限り、水の代わりに数多くの水性溶液を使用できる。

次いでこのブレンドを工業ブレンダーの中で、最大速度で、 $4^{\circ}\text{C}$ で10分攪拌することによりホモジナイズした。このホモジネート品の液化は、それをPolytron砕解拭に $4^{\circ}\text{C}$ で10分かけることにより得た。この段階で、残留粒子サイズは $500\mu\text{m}$ 未満であった。このブレンドを $13,600\times g$ で15分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離した。得られるペレットを24～48時間かけて凍結乾燥した。この第1画分を以降、凍結乾燥品又は固体抽出物と定義する。

この上清液を $24\mu\text{m}$ のWhatman濾紙で濾過し、限外濾過カラムの性能に影響を及ぼす粒子を排除した。その濾過材料を $500,000$ ダルトンの孔を有する接線流式濾過カラムで $4^{\circ}\text{C}$ で限外濾過にかけた。その上清液を $0.22\mu\text{m}$ のフィルターで無菌濾過し、更なる使用のために無菌ボトルに小分けした。この画分は以降、上清液又は液体抽出物と呼ぶ。

出物と呼ぶ。

他方、凍結乾燥品及び上清液を得るためのより性能の高い手順が開発された。 $13,600g$ で15分の遠心分離、それに続くWhatman濾紙での大雑肥な濾過の段階を、 $30\mu\text{M}$ の孔のナイロンポケットの装備したCEPA遠心機の中での $3,000\sim 4,000g$ での遠心分離に置き換えてよい。30分以内に $20\text{Kg}/20\text{L}$ の調製品をこのように

して遠心分離し、そして20リットルの上清液が供される。得られる水質容積は水の出発容量よりさえも大きく、これは軟骨自体の水含有量の一部さえも回収されたことを意味する。この凍結乾燥品及び上清液は以下の組成を有する。

凍結乾燥品：

脂質	7.35% <sup>1</sup>
タンパク質	46.2% <sup>2</sup>
水分	20.4%
ナトリウム	4.16mg/g <sup>3</sup>
カリウム	2.64mg/g
カルシウム	114 mg/g
マグネシウム	1.49mg/g
亜鉛及び鉄	微量

上清液：

脂質	0.10% <sup>1</sup>
タンパク質	8 mg/ml <sup>2</sup>
水分	98.8%
ナトリウム	33.6mg/100 g <sup>3</sup>
カリウム	39.2mg/100 g
カルシウム	2.0 mg/100 g
マグネシウム	1.1 mg/100 g

亜鉛及び鉄	微量
-------	----

<sup>1, 2</sup>AOAC薬局方 (1984) 16,219-220 及び 2,055章のそれぞれに公開の仕様に従って測定；

<sup>3</sup>SAA 手順に従って測定。

タンパク質含有量はケルダール法により評価した。この方法は実際には有機窒素 (N) を測定する。有機窒素は以下の式を利用することにより等価のタンパク質に換算される：

$$\text{タンパク質含有量 (mg/ml)} = \frac{\% \text{ N} \times 6.25}{100}$$

炭水化物は検出できず、それらはいづれか又は別の抽出物の中に存在していると推定できるが、しかしプロテオグリカン類及び／又はムコ多糖類の形態で存在しているであろう。これらの化合物は測定された水分のレベルで含まれている可能性がある。この凍結乾燥品は予期せぬレベルの水分を含み、それはOH基により測定された。20%の水分含有量は軟骨において通常回収される炭水化物のパーセンテージに近いが、凍結乾燥品の水分は0%に近いであろうため、この仮説は確認すべきものであるまま残った。

無菌は、

- 1) Laboratoire de genie sanitaire du Quebec Inc. 1090, 1<sup>er</sup> E  
scarbot, Centre Industriel St-Malo, Québec G1N 4J4 ; 及び
- 2) Northview Laboratories Inc. 1880, Holste Road, Northbrook IL, 60062  
U. S. A (FDA登録番号14-18028) ;

によるUSP XXII仕様を適用することにより管理した。

活性アッセイ :

凍結乾燥品 :

インビトロアッセイ :

これらのアッセイはホルモン依存性癌細胞系 MCF-7 及びZR75-1 (ATCC (R) 22-HTB 及び1500-CRL のそれぞれ) に対して行った。

ZR75-1 細胞 :

基本RPMI培地 :

フェノールレッドの入っていない52 g のRPMI 1640 (Sigma R8755) 、17.875 g のHepes(遊離酸 : Sigma H0763)、0.55 g のピルビン酸ナトリウム(Sigma P5280) 及び10 g のNaHCO<sub>3</sub>を5 Lの純水の中で混合し、そしてNaOHでpH7.40にした。

直ちに使用しないなら、この溶液は光不安定性物質を守るために光から遮断されていなければならない。この溶液を濾過し、500mlの無菌ボトルに分注し、そして最大3ヶ月4℃で保存した。



細胞培養維持培地：

基本RPMI培地に10% (v/v) のFBS(胎児牛血清)、100UのペニシリンG/50  $\mu$ gの硫酸ストレプトマイシン(Sigma P0906)/ml, 2mMのL-グルタミン(Sigma G1517)及び1nMの $E_2$ ( $\beta$ -エストラジオールSigma E8875)を添加した。

実験培地

基本RPMI培地に5%のFBSA(デキストラン・チャーコール上に吸着させた胎児牛血清)、2mMのL-グルタミン、100UのペニシリンG/50  $\mu$ gの硫酸ストレプトマイシン/ml培地及び50ng/mlのインスリン(Sigma)を加えた。この培地に上昇していく濃度の上記の凍結乾燥品及び種々の濃度のエストラジオール( $10^{-12}$ ~ $10^{-5}$ M)を加えた。

MCF-7細胞：基本 DME-F12培地：

DME-F12培地(炭酸水素酸塩及びフェノールレッドが入ってい

ない；Sigma)を製造業者の仕様に従って純水で再構築した。1リットル当り、1.2gの炭酸水素ナトリウムを加え、そしてpHをNaOH/HClで7.40にした。この溶液を濾過し、500mlの無菌ボトルに分注し、そして最大3ヶ月4℃で保存した。

細胞培養維持培地：

基本 DME-F12培地に10% (v/v) のFBS(胎児牛血清)、100UのペニシリンG/50  $\mu$ gの硫酸ストレプトマイシン/ml培地、2mMのL-グルタミン(Sigma)及び1nMの $E_2$ (エストラジオール)を加えた。

実験培地：

基本 DME-F12培地に5%のFBSA(デキストラン・チャーコール上に吸着した胎児牛血清)、2mMのL-グルタミン、100UのペニシリンG/50  $\mu$ gの硫酸ストレプトマイシン/ml培地及び50ng/mlのインスリン(Sigma)を加えた。ZR75-1細胞に関して述べた通り、凍結乾燥品及びエストラジオールを同じ濃度で加えた。

FBSAの調製：

胎児牛血清を1% (w/v) のチャーコール(アルカリ脱色炭素)と混合した

。デキストランT70の溶液をこのチャーコール-血清溶液に加え、0.1% (w/v) の濃度にした。この混合物を4℃で一夜攪拌した。10,000 g, 4℃で30分遠心分離後、血清をデカンテーションし、再び同じ比率のチャーコール及びデキストランと混合し、室温で3時間攪拌し、そして再び遠心分離した。次いで血清を56℃で20分かけて熱不活性化にかけ、無菌濾過し、そして無菌三角Falconチューブに小分けした。

ZR75-1 及び MCF-7 細胞を、24穴プラーク上で20,000細胞/ウェル又は6穴プラークの上で150,000細胞/ウェルの集団密度に到達するまで増殖させ、そして上記の通りに調製した様々な濃度の凍

結乾燥品の存在下又は非存在下で処理した。実験は全て三重測定で行った。培養培地を2日毎に抜き取り、そして新鮮な培地と交換した。細胞をインキュベーターの中で5%のCO<sub>2</sub>を含む定常的に多湿な雰囲気下で37℃にて、17, 7, 3又は3日間、それぞれ第1、第2、第3又は第4実験に対応させて増殖させた。細胞増殖阻害は細胞の直接計測により、又はウェルの全DNA含有量を測定することにより測定した。

凍結乾燥品の濃度	細胞阻害 (%)	
	MCF-7	ZR75-1
<u>第1実験: 17日</u>		
1 mg/ml	1.5	2.00
5 mg/ml	14.33	33.6
10mg/ml	62.66	90.8
<u>第2実験: 7日</u>		
1 mg/ml	3.73	0.97
5 mg/ml	15.7	29.00
10mg/ml	68.37	66.00
<u>第3実験: 3日</u>		
50mg/ml	95.8	95.00
100mg/ml	94.6	98.00
<u>第4実験: 3日</u>		
10mg/ml	34.4	51.5
20mg/ml	62.5	70.5
50mg/ml	95.8	95
100mg/ml	94.6	98

上記の細胞増殖阻害率は、この凍結乾燥品がこれら2種の細胞系の細胞増殖を用量独立式に阻害できることを示している。

図1は50及び100mg/mlの用量の凍結乾燥品が、処理の3日後にこれらの細胞系に対して発育不全を明確に誘発することを示す。

図2は、 $10^{-12}$ ~ $10^{-9}$ Mのエストラジオールの存在下で、処理細胞はこれらのホルモン用量率により刺激されないことで、コントロール細胞と同じように応答することを示す。しかしながら、1nMを超えると、コントロール細胞は強く刺激され、そしてDNAの濃度は $10^{-7}$ Mのエストラジオールの存在下で $3.75\mu\text{g}$ に達した(それに対し、エストラジオール抜きのコントロールでは $0.69\mu\text{g}$ であった)。30及び50mg/mlの凍結乾燥品により処理した細胞においては、最大刺激において測定されたDNAはそれぞれ1.9及び $1.8\mu\text{g}$ であった。図2は、エストラジオ

ールに対する処理細胞の親和定数 ( $K_m$ ) が、30及び50mg/mlそれぞれの存在下で、コントロール細胞の $K_m$ の値より3及び16倍高いことを示す。これは、軟骨凍結乾燥抽出物が存在しているとき、同じ細胞増殖を得るにはより高い濃度のエストラジオールが必要とされることを意味する。従って、この抽出物は最大応答を下げ (その90%の阻害)、そしてエストラジオールに対する処理細胞の親和定数を強める。

インビボアッセイ:

400匹の生後40日目の雌スプラーグ・ドーリーラット (Charles River Co., St-Constant, Québecより購入) をその環境に12日間順応させた。この時点で20mgのDMBA/1mlのコーン油 (9, 10-ジメチルー1, 2-ベンズアントラセン; Sigma Chemical Co. より購入) をガベージにより投与した。この処置の3ヶ月後、発達した乳癌を有する240匹のラットを選び、そして2グループに分けた。第1グループはラットの5つのサブグループより成る。処置したグループのラットに8週間にわたり3mlの水の中の増大していく濃度の凍結乾燥抽出物を与え、一方コントロールグループには同容量の水を

与えた。第2グループはラットの4つのサブグループより成る。処置したグループのラットには、10週間にわたり上清液と組合せた又は組合せていない3mlの水の中の凍結乾燥品 (約25mgのタンパク質) を毎日与え、一方コントロールグループには同容量の水を与えた。第2グループのラットの1のサブグループのみを3000mg/Kg/日の濃度の凍結乾燥品で処置し、そして3mlの上清液もより少ない用量の上清液 (1mlの水中約8mgのタンパク質) の腹腔内 (i. p.) 注射により与えた。

ラットはこの2通りの実験の始めでは151~175gの重さであり、そして適量のえさ及び飲料水を与えた。第1グループのラットは0.9cmの平均直径の腫瘍を有し、一方第2グループのラットは0.6cmの平均直径の腫瘍を有していた。

その結果を以下にまとめる:

ガベージにより投与した軟骨抽出物  
の毎日の用量

%腫瘍増殖阻害率（コン  
トロールに対する腫瘍直  
径の縮小）

第1実験：8週間

500mg/Kg/日	2%
1000mg/Kg/日	4%
3000mg/Kg/日	14%
5000mg/Kg/日	15%

第2実験：10週間

3000mg/Kg/日	12%
3000mg/Kg/日 + 3 ml 上清液	18%
3000mg/Kg/日 + 3 ml 上清液	20%

+ 1 ml i. p. 注射上清液

これらの結果は、この凍結乾燥品が、胃腸管の中に吸収され、且

つ腫瘍のサイズに作用する活性成分を含むことを示す。この作用は腫瘍細胞に対する直接的な作用又は抗脈管形成媒介作用でありうる。

これらの結果は、この上清液が約5%の腫瘍サイズの追加的な縮小により反映される活性を、非常に希釈されたときでさえも有することも示す（3 mlの上清液の中に存在しているタンパク質の量は約25mgである）。

組織学

軟骨抽出物の活性分子の無毒性を評価するため、上記のインビボ実験において利用した動物を断頭により殺し、そして分析のために以下の組織を採取した：肝臓、肺、腎臓、心臓、脳、筋肉及び乳腺。これらの組織から脂肪を取り、その後それらをBouin 流体の中で2日間かけて固定した。エタノール中で脱水後、固定化組織をパラフィンの中に包埋した。その切片を得、スライドガラスの上に載せ、ヘマトキシリンで染色し、そして顕微鏡観察した。

組織学検査は、最大用量の凍結乾燥単独を用いたとき（データは示さず）、又は上清液と組合せた凍結乾燥品を用いたとき、有害な作用がないことを示した

(図3 a 及び b, 4 a 及び b、並びに 5 a 及び b を参照のこと)。

このことは、この凍結乾燥品及び上清液が特異的な腫瘍サイズ退行活性を有することを示唆した。

癌性乳腺において(図6 a 及び b)、血管の面積の重要な縮小が観察された。これら活性分子の抗脈管形成作用は以下の写真及び棒グラフに例示及びまとめた結果により確認した。

図7は、凍結乾燥品(p. o.) - 上清液(p. o. + i. p.) の組合せを利用したとき(図6 a 及び b を参照)、血管面積の55%の縮小が観察された。

腫瘍サイズの縮小はその血管形成の著しい低下、腫瘍細胞に対する直接的な作用、又は両方の現象の組合せに基づきうる。これらの抽出物の抗脈管形成作用は上記でよく説明した。直接的な発育不全作用がホルモン依存性細胞にインビトロで観察され、これはインビボで確認されるべきであるとなった。

上記の結果は、この上清液がZR75-1細胞に対する凍結乾燥品の作用に勝る、且つ超える強い作用を有することを示したため、その成分を更に調べた。  
活性分子を含む液体画分の獲得

サメの軟骨を獲得し、そして濃縮段階を省略することを除き上記と同じように処理した。遠心分離後、そのペレットを捨て、そしてその上清液を上記のようにして0.22  $\mu$ mのフィルターでの無菌濾過で処理した。

この上清液を以降、粗浸透物、例えば限外濾過後の生成物と呼ぶ。

このようにして得られた粗浸透物をFPLC(ファスト・プロテイン・液体クロマトグラフィー)に通した。

#### FPLC条件:

カラム: ハイロード26mm $\times$ 60cm Sephacryl S-300

FPLCシステム: Pharmacia 由来

サンプルは全て、カラムに載せる前に0.22  $\mu$ mのフィルターで濾過した。溶出バッファーはリン酸バッファー食塩水(PBS)とし、濾過し、そして15分間脱気しておいた。添加サンプルの容量は通常 3.2mlとした(13mlまで可能)。流速は1 ml/分とした。10mlの画分を集めた。溶出した化合物をそのU. V. 吸収により

検出した(280nm)。校正チャートをSigma 由来のMW-GF-1000校正キットを用いることにより得た。この校正サンプルは分析する添加サンプルと同

じ容量を有する(3.2ml)。サンプルの溶出容量は、校正キットの化合物の分子量を、カラムのボイド容量を差し引いたその溶出容量に対してプロットして推定した。ボイド容量はデキストランブルー(M. W. =2,000,000)を注入することにより得た。

その画分をその活性のためにZR75-1細胞で試験した。注目の画分を同定し、そしてその特性を更なる研究により確認した。

浸透物の活性成分の更なる特性決定をRotofor (Biorad 170-2950; 以下の等電点電気泳動を参照のこと)、並びに10~30KD, 30~100KD 及び 100KDより大きい分子量の画分を得るための種々のカットオフ値のAmiconフィルターで行った。

#### 等電点電気泳動:

サメの軟骨の調製品(46mlの浸透物1Kg/L)を5%のグリセリンを含む純水4lに対し、4℃で、Spectra pore #7 MWC0 3500KD(Spectrum 132110)膜を用いて一夜透析した。透析した溶液を2.75mlの両性高分子電解質(Pharmacia #80-1125-87) pH 3.5~10.0及び0.5gのチャプス(Sigma C3023: 3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパネースルホネート)と混合した。容量を純水で55mlにした。この溶液をRotofor に載せた。等電点電気泳動は、4℃にて、12ワットの定常電力(3000xi電源: Biorad 165-0554)において、温度の維持を確実にするために定常水循環のもとで行った。分離の開始では、電圧は380ボルト、そして電流は31mAとした。電流が安定すると(14mA)、電圧は870ボルトとなった。等電点電気泳動をやめ、そして20画分を集めた。

画 分	容 量 (mL)	pH
1	3.7	3.56
2	2.1	4.01
3	2.2	4.18
4	2.3	4.31
5	2.2	4.63
6	2.1	5.03
7	2.5	5.30
8	2.1	5.50
9	2.4	5.81
10	2.5	6.26
11	2.3	7.00
12	2.4	7.29
13	2.4	7.64
14	2.5	7.94
15	2.3	8.32
16	2.5	8.62
17	2.4	8.94
18	2.9	9.30
19	3.1	9.88
20	3.6	10.71

これらのタンパク質の同定はその分子量を電気泳動ゲルで見積ることにより行った (Laemmli, U. K. (1970) Nature (Lond.) 227:680)。

これらの画分を添加バッファー (Laemmli 参照) で4倍に希釈し、そして8 ml のアリコートを用いて非還元条件下の電気泳動にかけた。図8は各画分及び等電点電気泳動前の物質の電気泳動プロフィールを

示す。

画分全てを層流フードのもとで、それらを0.22  $\mu$  mの孔を有する無菌 Millipa



ck-60フィルターに通すことで無菌ボトルに詰めた。

画分のタンパク質含有量をローハー用量法により評価した。1 Kg / 2 L (浸透物 1 リットル当りの粗軟骨重量として表示) の溶液を培養培地中の様々な濃度においてZR75-1細胞に対して試験した。その結果を以下にまとめる。

### 第1試験：

浸透物を凍結乾燥し、そしてFPLCに通した。発育不全活性は検出できなかった (データは示さない)。

### 第2試験：

試験はRotofor 画分で行った：タンパク質の同定

同定画分	等電点	中間値	分子量
7-8-9-10	5.30~6.26	5.78	29±1 KD
7-8-9	5.30~6.26	5.68	60±1 KD
12-13-14	7.29~7.94	7.62	48±1 KD
13-14	7.64~7.94	7.79	35±1 KD

### FPLC画分で行った第3試験：

画分	分子量
6と7	1-2.5 KD

### Amicon分子フィルターで得た 100 $\mu$ l の画分で行った第4試験：

試験濃度	分子量	ZR75-1細胞培養物の阻害
100 $\mu$ g / mL	MW > 100 KD	64%
100 $\mu$ g / mL	30KD < MW < 100KD	114%
100 $\mu$ g / mL	10KD < MW < 30 KD	127%
400 $\mu$ g / mL	MW > 10 KD	149%

FPLC画分6と7は非常に小さい分子量(1~2.5KD)の活性成分を

含む。

画分の発育不全作用は凍結乾燥品で観察されるものの33,000倍まででありうる。上記の結果は、凍結乾燥が溶出液の中に含まれるタンパク質の活性を実質的に

破壊及び／又は阻害し、一方固体抽出物を凍結乾燥したときにはそのような失活は生じないことを示した。

溶出液の活性成分の更なる同定：

活性画分（ZR75-1細胞で試験）を以下の分子量範囲で獲得し、上記のFPLC及びRotofor 手順を利用し、直径10mm×長さ30cmのSuperose-12カラムでの同じ浸透物（1Kg/L）で出発する別のタイプ精製により決定した。1ml/分の流速を選定した。1mlの画分45本を集めた。

画分20～21	70～120KDの分子量に対応する画分 において活性
画分22	60～70KDの分子量に対応する画分 において活性
画分29～32	35～46KDの分子量に対応する重複画分 において活性
画分34～35	29KDの分子量に対応する画分 において活性
画分38～39	1～2.5KD の分子量に対応して活性

特異性

腫瘍細胞に対する活性の特異性を評価するため、限外濾過の後に得られる浸透物を間葉細胞、即ち正常な線維芽細胞であるヒトTENON 線維芽細胞(HTF)に対して試験した。

B. インビトロ

a. 患者

2人の患者（1人は新生血管緑内障NVGを有し、そしてもう1人

は一次解放角緑内障POAGを有する）由来のHTFのみを使用した。

b. HTF の継代培養及び維持

各集密培養物を 0.5mlの0.05%のトリプシン/0.5mM のEDTA (Gibco 610-5300 AG) により37℃で5～10分かけて洗浄及び脱離させることにより継代した。15%のFBS を含む 1.5mlの DME/F-12培地をトリプシン/EDTAを中和するために加

えた。

細胞の合体は、10%のFBSを含む追加培地の入った25cm<sup>2</sup>のT-フラスコの中にばらばらにして移し入れることにより行った。集密に達した後、HTFを75cm<sup>2</sup>に、そして最後に180cm<sup>2</sup>のT-フラスコに移し入れた。十分な細胞が得られたら、一部の細胞を以下の通りの実験のために用い、そして同時に残りを更なる実験のため、同一の継代培養物を保存するよう凍結した。

#### c. 実験プロトコール

集密に達したら、2又は3本の同じ180cm<sup>2</sup>T-フラスコの中で増殖させた。一人の患者由来の細胞を上記の手順により解離させた。短い低速遠心分離の後、それらを256チャネライザーの付いたZMIカルターカウンター216013で計測した。

以降の全てのインビトロ実験に関し、約50,000個の細胞を16mmの皿及びロ穴プレートの中の1%のFBSを含む1mlのDME/F-12培地に接種した。接種して17時間後、1%のFBSの添加した1mlの新鮮な同じ培地（「絶対」コントロール）を加えた。実験計画に依存して（上記及び下記参照）、1%のFBS培地はGF（成長因子）又は浸透物1Kg/2L（軟骨重量/水容量）溶液を加えるか又は加えないか、そして無菌濾過した。この日（0日目）に、細胞の一部のサンプルをプレート効率を決定するために計測もした（それは95%以上であるべきである）。

実験を開始して48時間後、細胞をすすぎ、そして上記の手順によ

り解離し、そして再び計測した。細胞の数は「絶対」コントロールで得られるそのパーセンテージとして表わす。

1%又は5%のFBSを含む各「絶対」又は陽性コントロールそれぞれ、及び1%のFBS及び個々のGF又は軟骨浸透物の添加された各実験グループは三重測定サンプルより成る。

各実験を同時に1又は2人の患者の細胞で実施し、そして少なくとも2回繰り返した。

成長因子（GF）又は軟骨浸透物による線維芽細胞の増殖の刺激を5%のFBSによるその刺激と対比させた。

これらの実験において、GF、ブタPDGF (pPDGF) 及びヒト組換bFGF, hr bFGF (Farmitalia Carlo Erba, Milan, ItalyからDr. P. Brazeauに贈呈) を1%のFBSの中に10~100 ng/mlの濃度でそれぞれ加えた。実験を開始して48時間後、細胞をトリプシン-EDTAにより分散させ、そしてカルターカウンターで計測した。以下に示す全ての3重測定値 (1, 2 及び 3 行目) はウェル当り 1 / 20 カウントに相当する。

患者D: 緑内障 性: 男 年齢: 53

HTF

日-1: ウェル当りの細胞数: 46170

DME/F12-1% FBS-1% Pen. Strep

日 0: ウェル当りの細胞数: 65214

DME/F12-1% FBS-1% Pen. Strep

日 1: ウェル当りの細胞数: 62548

DME/F12-1% FBS-1% Pen. Strep

日 2: ウェル当りの細胞数:

DME/F12-1% FBS-1% Pen. Strep

細胞数/カウント

サンプル プレート		1	2	3	AVG.	SEM	% コントロール 増殖
DME/F12							
プレート#1 FBS	1 日 0 1% FBS	3.019	2.862	2.853	65.214	71	
	2 日+1 1% FBS	2.711	2.973	2.693	62.548	1.655	
	3 日+2 1% FBS	2.284	2.400	2.191	51.333	1.655	100
	4 日+2 5% FBS	3.084	2.834	3.115	67.446	1.627	131 111
DME/F12							
プレート#2 PDGF	5 コントロール (1% FBS)	2.558	2.181	2.216	51.931	2.199	100
	6 1 ng/ml 1% FBS	2.425	2.580		56.056	1.228	108
	7 10 ng/ml 1% FBS	4.080	3.975	4.282	92.116	1.648	177 1111
	8 100 ng/ml 1% FBS	4.625	4.356	4.450	100.285	1.442	193 1111
DME/F12							
プレート#3 b-FGF	9 コントロール (1% FBS)	2.915	2.533	2.502	59.360	2.429	100
	10 1 ng/ml 1% FBS	2.744	2.554	2.761	60.174	1.213	101
	11 10 ng/ml 1% FBS	3.606	3.143	3.193	74.234	2.683	125
	12 100 ng/ml 1% FBS	4.064	3.033	3.026	75.585	6.307	127
DME/F12							
プレート#4 軟骨 (1Kg/2L) (filtered)	13 コントロール (1% FBS)	2.826	2.566	2.486	58.822	1.877	100
	14 1 $\mu$ l/ml 1% FBS	2.729	2.576	2.575	58.837	936	100
	15 10 $\mu$ l/ml 1% FBS	2.643	2.493	2.584	57.643	798	98
	16 100 $\mu$ l/ml 1% FBS	2.918	2.883	2.766	58.483	2.461	99

11 P &lt; 0.02

111 P &lt; 0.01 スチューデント-フィッシャー検定により決定

PDGF (血小板由来成長因子) 及びbFGF (塩基性線維芽細胞成長因子) の如き成長因子はHTF に対する刺激を示すが、それらの細胞を軟骨浸透物の存在下 (1 Kg / 2 L) で増殖させたとき、陽性であろうと陰性であろうと、何ら作用も観察されなかった。発育不全作用も観察できなかった。これは、浸透物が、腫瘍細胞に

対して特異的であり、正常細胞に対しては有意な作用を及ぼさない、発育不全作用を有することを示唆する。この軟骨抽出物は別のタイプの線維芽細胞HSF（ヒト皮膚線維芽細胞）に対しても作用を有さなかった（データは示さない）。試験していないが、凍結乾燥品も正常細胞に対して何ら作用を示さないと推定される。

#### 臨床試験

予備臨床試験に入る前に、限外濾過の後に得られる粗浸透物を2及び20倍濃縮し、濃厚な活性浸透物を得た。これらの濃度のレベルは1000ダルトンの孔を有する接線流式濾過カラムで得た。このカラムは溶出液の容量を2及び20分の1に減じた。この濃縮浸透物を0.22  $\mu$ mの孔のミリポアフィルターで濾過した。軟骨を別の遠心分離法で処理したとき（30  $\mu$ Mの孔の膜を有するCEPA遠心機を使用）、10倍濃縮が、上記の20倍濃縮抽出物とほぼ同じタンパク質レベルを有する濃縮抽出物の獲得を達成せしめた（例えば14mg/ml（実験室スケール法）の代わりに12mg/ml（改良法））。無菌10倍濃縮浸透物を無菌フラスコの中に7mlのアリコート（約85mgのタンパク質）で分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で一夜凍結し、そして利用するまで更に $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。粗及び濃縮浸透物の主たる相違はそのタンパク質濃度である。タンパク質濃度を決定するために用いられる方法は窒素化合物を測定するものであり、タンパク質のみを測定するものではないことに注目すべきである（ケルダール法）。これはなぜタンパク質の濃度が容量の濃縮レベルに比例して上昇しないかの説明となりう

る。ローリー法によりタンパク質濃度を決定するときは、その上昇が普通である。従ってこの濃縮工程は水及び低分子量窒素化合物を浸透させると推定される。

脈管形成依存病を処置するために濃縮浸透物を使用した。2種類のタイプの代表的な脈管形成依存症をヒトで実際に試験してみた。第1のタイプは皮膚病（乾癬）であり、第2のタイプは癌（前立腺癌）とした。

皮膚病のうち、乾癬症例を選んだ。試験した乾癬症例のうち、角質増殖症の併発した及び併発していない乾癬間の相違を認識しておくことに価値がある。この病気の角化症成分は本質的に濃縮軟骨浸透物により実質的に影響され、一方、そ

れに反して、脈管形成成分はこの活性成分混合物の選り抜きの標的である。以下の実施例はこの状況を説明及び確認する。

前立腺癌に苦しむ患者が自発的に10倍濃縮軟骨浸透物を試してみた。この患者は一連の系統的な慣用の治療を受け、それは一時的には成功した。彼は最近になり、彼の癌が常習性を示すようになってから軟骨抽出物を摂取し始めた。

以下に示す結果は非常に有効であり、そしてそれは試験した特異的なものに限らず、全ての脈管形成依存症の処置において粗浸透物及びその画分が有用である指標と認められる。病気が脈管形成成分を有する限り、本発明の軟骨抽出物は、それが有効な量のそれを含む組成物となっており、且つこの組成物が適正な投与にとって適切な形態となっていることを条件として、この観点において有効であろうと認められる。従って、本発明は以下の特定の組成物に限定されず、その理由は当業者は数多くの組成物を誘導することかできるからであり、その選択はその投与の態様及び標的とする病的組織により指定される。組成物は様々な経由、例えば局所、経口、舌下、

直腸、静脈内、筋肉内、点滴、等により投与されうる。

乾癬：

以下の皮膚用組成物の作り、そして乾癬に苦しむ患者でのその薬効を確認するために試験した：

- Emulgade (商標) CLB 29% (w/w)
- 20倍粗浸透物 69.5% (w/w)
- Germaber (商標) II 1% (w/w) 及び
- ラバンドゥラ・アングスチフォリア (Lavandula Angustifolia) 0.5% (w/w)

ステアリン酸エステル、脂肪アルコール及び非イオン性乳化剤の混合物である Emulgade (商標) CLB (Henkel Canada Ltd. より購入) を攪拌しながら65~70℃に加熱した。加熱を止め、その際混合物は攪拌し続いた。混合物が45℃の温度になったら、エッセンシャルオイルラバンドゥラ・アングスチフォリア及び保存剤 Germaben (商標) II (ジアゾニジル尿素30%、メチルパラベン11%、プロピルパ

ラベン3%及びプロピレングリコール56%；Sutton Laboratories, NJ, U. S. Aより購入）を加えた。混合物の温度が30℃になったら、軟骨抽出物を加えた。このようにして得られた組成物は滑らかな非グリース状のクリームであった；Emul gade（商標）の比率を変えることにより、その他の形態の様々な粘性皮膚用組成物が、その製造者の仕様に従って得られうる（ミルク、ローション、オイントメント）。その他のビヒクル又は賦形剤を使用して、ペースト、ゲル及び任意のその他の経皮製剤を得ることができる。

上記の製剤を、乾癬に苦しみ、試してみた慣用の治療に対して応答性ではあったがしばらくして難治性となった10人の患者のパネルに12週間にわたって毎日2回与えた。この研究のため、両足上に類似、且つ対称的な度合いの乾癬をもつ患者を選んだ。これらの試験

は二重めかくし式に行い、皮膚科医も患者のいずれもどちらの疾患側が軟骨抽出物含有組成物で処置したものであり、そしてどちら側がコントロール組成物で処置したかを知らないようにした。角質増殖症の併発していない乾癬をもつ5人の患者においてめざましい改善が認められた；2人の患者は身体部の写真を図9 a）及び9 b）に示す。図9 a）において、角質増殖症を有する乾癬により冒された患者は、それにもかかわらず、1ヶ月の処置の後、かゆみを伴わずに、紅斑の非常に有意な縮小を示していることが実証されている。しかしながら、角質増殖症は有意に残っていた。角質増殖症の併発した乾癬に苦しむ第2患者の写真（図9 b）は3ヶ月の処置の後にはるかに優れた改善を示した。乾癬は多重因子の病気のようなため、患者の応答はその症状の成立及び永続における脈管形成因子の有意な関与に依存すると推定される。この種の製剤が、その他の関与因子を標的とするその他の治療剤（角質溶解剤、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤、免疫抑制剤、等）により補足されたとき、より良い結果が得られうるであろう。

この補足は、例えば有効な量の角質溶解剤を含ませるように製剤を改変する態様をとりうる。これはかかる補足治療剤を、本局所製剤の服用と一緒に、又は交互に独立して投与させることによっても達せられうる。更に、補足医薬品は同一の経路により投与される必要はない。



上記の製剤は、高比率の軟骨にもかかわらず、全身作用を示さず（その作用は処置した足に限定されていた）、そして副作用もなかった。

アクネ：

本発明者はアクネに精通はしていないが、アクネは脈管形成成分を有する病気又は障害に分類されているにもかかわらず、それに冒

された患者で液体軟骨抽出物を試験する試みはなされていなかった。アクネにより冒されている患者において軟骨抽出物を実験するため、以下のゲル製剤を作った：

Carbopol（商標）1.2%

精製水 77.2%

NaOH 0.3%

Phenoxetol（商標）0.3%

Tween 80（商標）0.3%

2倍軟骨抽出物 20.0%

40倍アロエ抽出物 0.5%

2倍軟骨抽出物は9～12mg/mlのタンパク質を含む。この製剤は多少重症なアクネにより冒された患者の皮膚の外観の著しい改善を示す（炎症性アクネ及び囊肿性アクネ；データは示さない）。

これらの驚くべき結果は抗脈管形成作用に基づきうるか（それ故、アクネにおける抗脈管形成成分を示す）、又は抗脈管形成以外の作用を有する活性成分に基づきうる。ここでの抽出物は抗脈管形成作用以外の少なくとも一の作用を有することが見い出される。直接発育不全作用は癌細胞系において実証された。

癌：

前立腺癌に苦しむ1人の患者に10倍濃縮浸透物を試験した。腺癌は1986年において診断された。その時点では、放射線治療が行われた。1991年において、PSA（前立腺血清抗原）値は138 $\mu$ g/lであった。尚、正常許容上限は4 $\mu$ g/lである。従って患者は抗アンドロゲン療法（Euflex（商標））と組合せた去勢による、完全に異なる治療を受けた。この処置は3年間有効であり、その後PSA 値

は再び上昇し始めた。1994年6月以来、この患者は10倍の浸透物を摂取した（約1～1.5 mg/体重Kg/日に相当する。約75mgのタンパク

質/7mlの蒸留水の毎日の舌下用量）。この用量のほとんどを飲み込んだにもかかわらず、DMBA処置動物（上記参照）で得られる結果を頼りとする、それはおそらく胃腸管に吸収されてしまったであろう。PSA 値は12から $0.9\mu\text{g/ml}$ にまで下がった（最後の結果は1994年12月に得た）。この投与療法は、投与の経由、活性成分の生物学的有用性、及び病気を抑制すべき所望の積極性に従って改変してもよいであろう。この時点で、無毒性がラット（上記実施例参照のこと）及びヒト（データは示さない）において確認された。

DMBA処置ラットで実施したその他のインビボ実験においては液体抽出物の投与率は約190～220mgのタンパク質/体重Kgとし、それはおそらく癌血管面積の縮小に大いに貢献した（はるかに多い用量の凍結乾燥品と組合せたときは55%）。従って、1日当たり約1～約200 mg/体重Kgの用量が、脈管形成を抑制又は消失させることにより癌を処置するための合理的な中間用量域（ED<sub>50</sub>）である。

これらの結果は脈管形成依存症の処置における軟骨液体抽出物のすばらしい能力を示す。軟骨抽出物及びその製剤の量は特定の要望を満たすために変えてよい。活性成分を含む粗浸透物の画分も有効であろうと推定される。これらの画分は更なる特性決定が待たれる。

タンパク質含有量ベースで、皮膚に対する局所製剤は幅広い用量の軟骨抽出物を含みうる。例えば試験した症例の2つの特異的なカテゴリー内で、乾癬を処置するための製剤中の最終タンパク質濃度、対、アクネのその比は4～5であり、一方、浸透物の希釈率は35であった。脈管形成依存症における全ての予想される用途にとって（点眼剤から皮膚及び癌薬剤）、粗浸透物の最終タンパク質濃度は非常に低いであろう（0.1mg/ml未満）。この低い用量域は、作用部位に対する活性成分のアクセス性及び侵入性、並びにこれらの成

分の効率的な補足、更には脈管形成インヒビターに対する組織の感度又は反応に依存する。いくつかの用途にとっての製剤中の最終タンパク質の上限値は現在わ

かっている。製剤中のタンパク質の試験した最大の最終濃度は、乾癬症例に関しては9mg/mlであり、そして前立腺癌症例においては投与した7mlの用量単位において約12mg/mlとした。粗浸透物はその活性を失うことなく凍結乾燥できないため、最大用量は、例えば濃縮シロップが得られるまで粗浸透物に対して行うことのできる濃縮の限界に依存するものと認められる。

必要な材料：

クーラー；

手術器具；

ミートチョッパー；

プラスチック袋；

工業用ブレンダー (Fisher Scientific より購入したウォーリング 3 速ブレンダー) ；

水精製用システム (逆浸透及び0.1  $\mu$ m 濾過；Fisher Scientific、

Montreal, Quebecより購入した、Continental Water System、モデルPRE 2202

91089 号、Modulab Bioscience RQ/Polishing System) 。このシステムは高品質の無パイロジェン水を供する；

高精度ばかり (Fisher Scientific より購入；AE号) ；

遠心機 Sorvall RC-285 (Dupont Canadaより購入) ；

遠心機 CEPA；

30  $\mu$ M の孔のナイロンポケット；

オートクレーブ (自動蒸気滅菌器；Sanyo モデルMAC 350P) ；

Nalgene 500ml 容器：132°Cで10分滅菌し、35分乾燥；

孔24  $\mu$ m のWhatman Reeve Angel コンカルフィルター；

限外濾過用カラム (分子量カットオフ値：500 キロダルトン及び適用時1 KD；

表面：25平方フィート；流速130 l /分；入口圧：30psi；出口圧：5 psi；Koch Membrane Systems Inc., Wilmington, MA, USAより購入) ；

サニタリー遠心ポンプ (Monarch Industries、モデル ACE-S100、タイプA)

; 130 l / 分の流速を供する ;

無菌フード (Ingram & Bell より購入した層流フードNuAire) ;

Millipack-60 0.22  $\mu$  m 無菌フィルター ;

無菌の透明又は琥珀色のガラスボトル ;

濃縮器DC-10 Amicon ;

Rotofor Biorad 170-2950 ;

AmiconフィルターSIOY10, SIOY30及びSIOY100 ; それぞれカットオフ値10, 30  
及び100KD ;

FPLC Pharmacia 216007 (コンピューターPharmacia 216014) ;

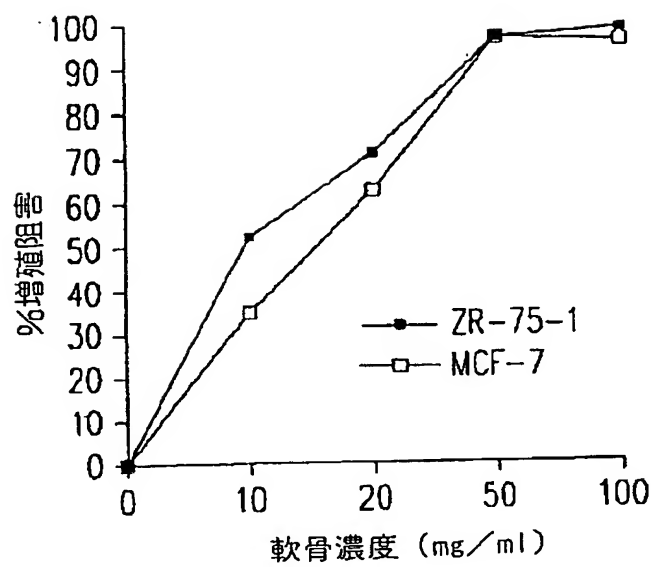
Hilstand S-300 26mm / 60cm (Pharmacia) ;

Superose S-12 10mm / 30cm (Pharmacia) ;

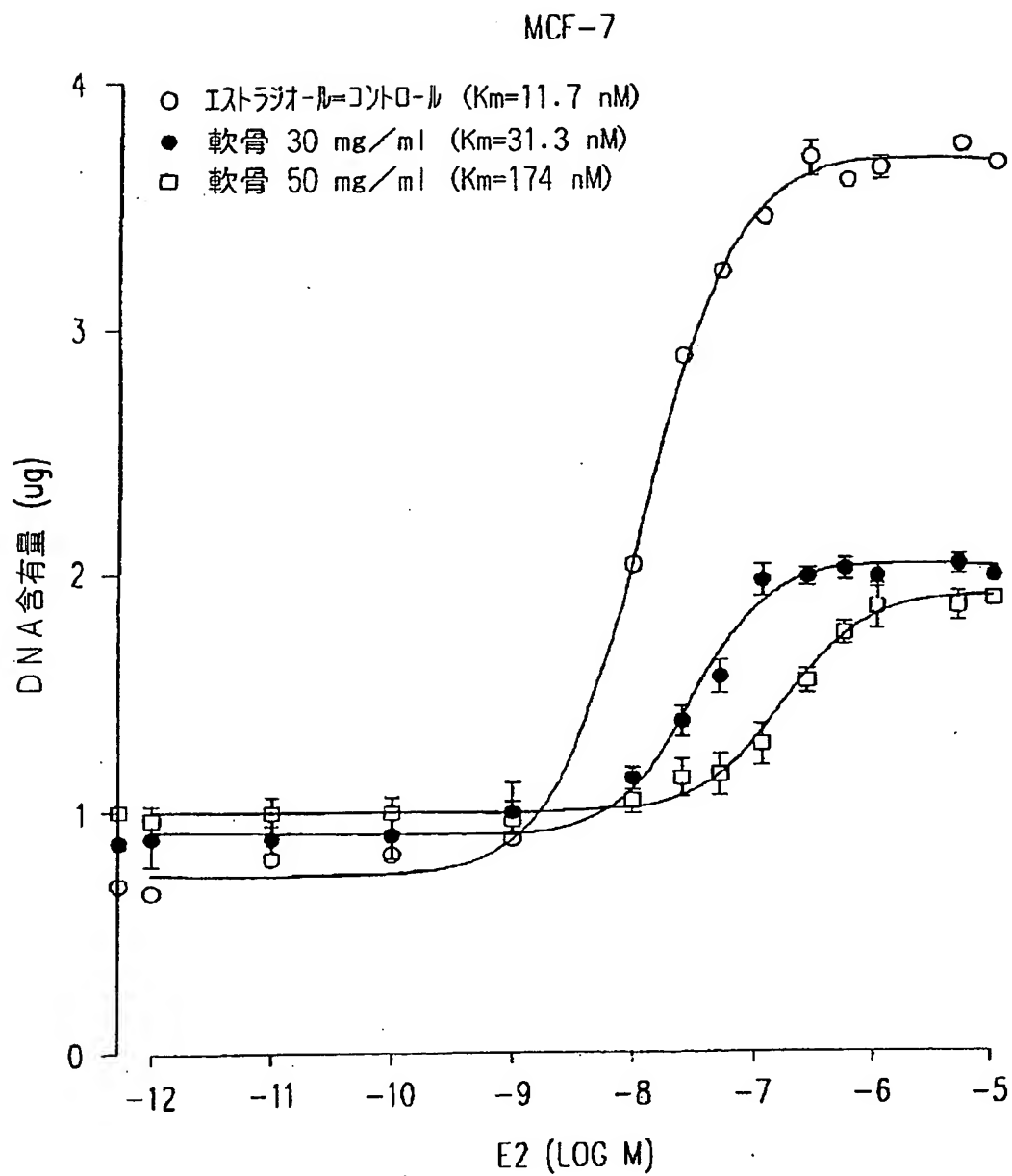
凍結乾燥器 Labconco 10273A

本発明を以上説明してきたが、当業者は本発明の範囲を逸脱することなく様々な改良又は改変を本発明に施すことができることを理解しているであろう。これらの自明な変更は本発明に包括される。

【圖1】

Figure 1

【図2】

Fig. 2

【図3】

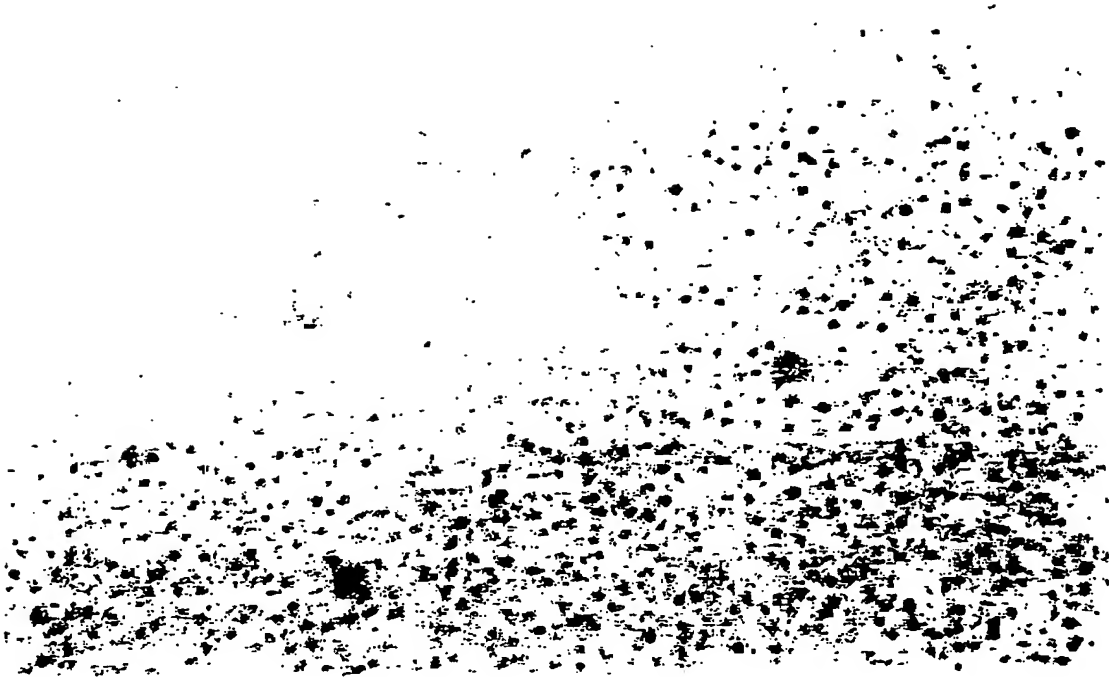


**Figure 3a**      コントロール動物からの肝臓切片。実質細胞の細胞質及び核は正常な外観を示した。×200。

各顕微鏡写真（倍率 ×200）は、コントロール（ビヒクル処理した）成雌ラット又は胃内チューブにより投与した最大用量のサメ軟骨抽出物により処置した成雌ラットのいずれかに由来する代表的な切片を示す。

BEST AVAILABLE COPY

【図3】 -

**Figure 3b**

処置動物の肝臓切片。細胞質及び核の外観はコントロール動物で観察されたものと非常に似ていた（Fig. 3a 参照）。変性変化は観察されなかった。×200。

BEST AVAILABLE COPY



【図4】

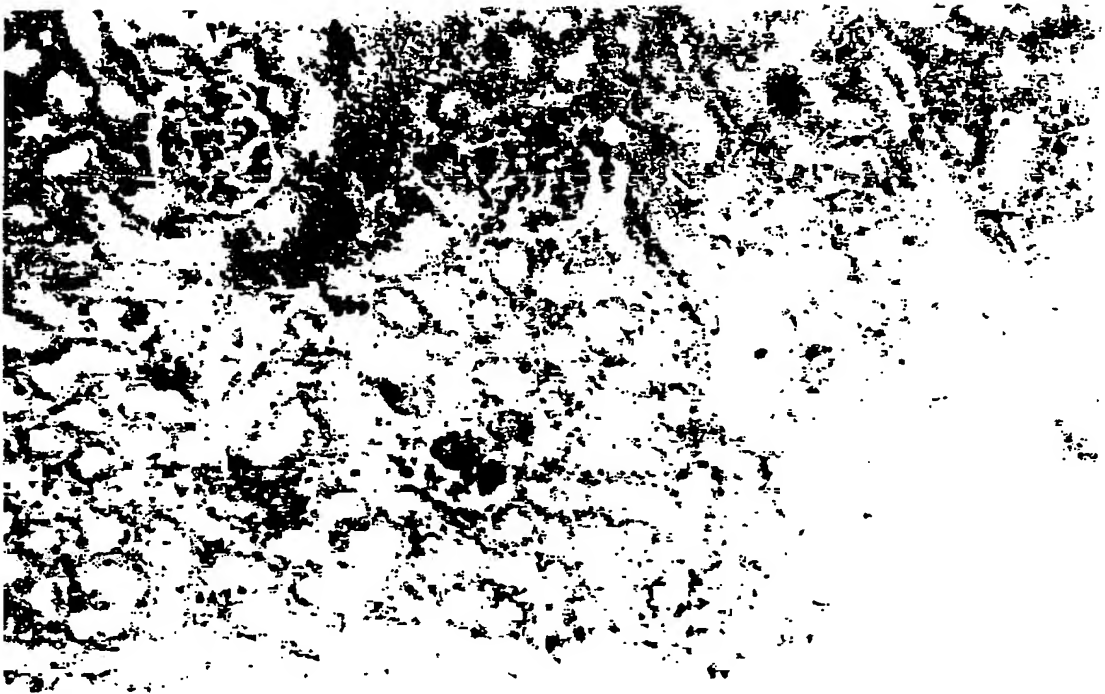
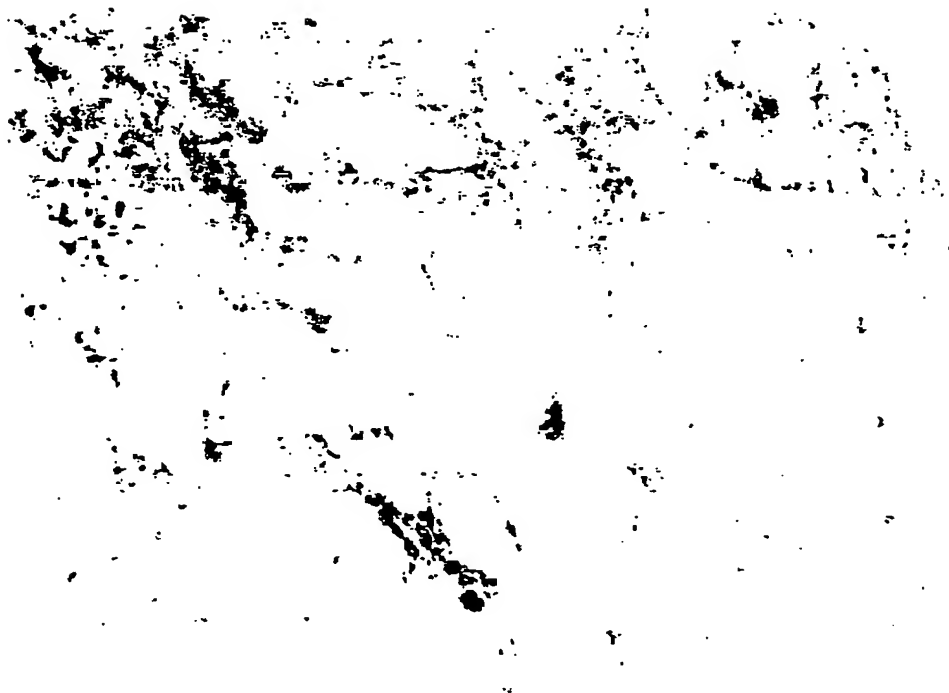


Figure 4a

コントロール動物。腎臓の皮質を横断する切片。管状細胞は全て正常に見え、きれいではっきりと細胞質が区切られていた。管状内腔は空であった。×200。

BEST AVAILABLE COPY

【図4】

**Figure 4b**

処置動物。腎臓の皮質を横断する切片。管状細胞は正常な外観を有していた。管の内腔の中に剝離細胞はなかった。毒性の徴候は検出されなかった。×200。

**BEST AVAILABLE COPY**

【図5.】

**Figure 5a**

コントロールラット。肺を横断する切片。細気管支（B）及び肺胞（A）の壁は無傷であり、表皮細胞がはっきり区分されていた。  
×200。

BEST AVAILABLE COPY

【図5】

**Figure 5b**

処置動物。肺を横断する切片。細気管支（B）及び肺胞（A）の壁の中の細胞は正常な外観を有し、コントロール動物で観察されたものと非常に似ていた（Fig. 5 a）。内腔には剥離細胞は全くなかった。×200。

**BEST AVAILABLE COPY**

\_【図6】

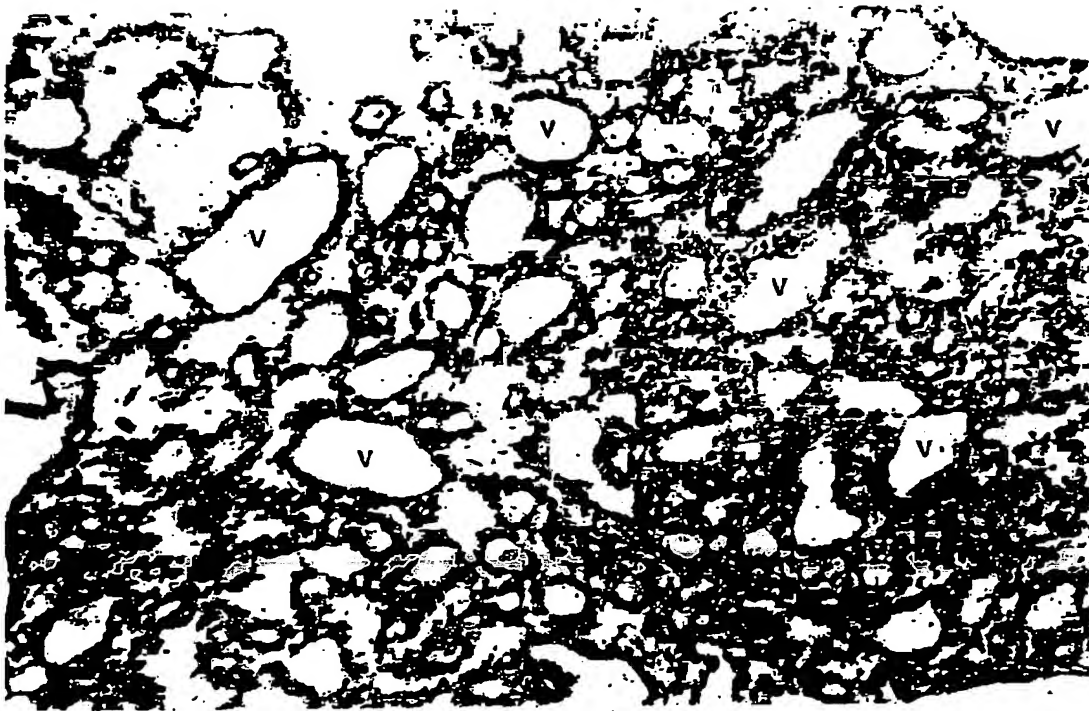


Figure 6a

コントロールラット。DMBA誘導乳腫瘍。血管が多く、そしてその一部(V)は大きかった。×120。

BEST AVAILABLE COPY

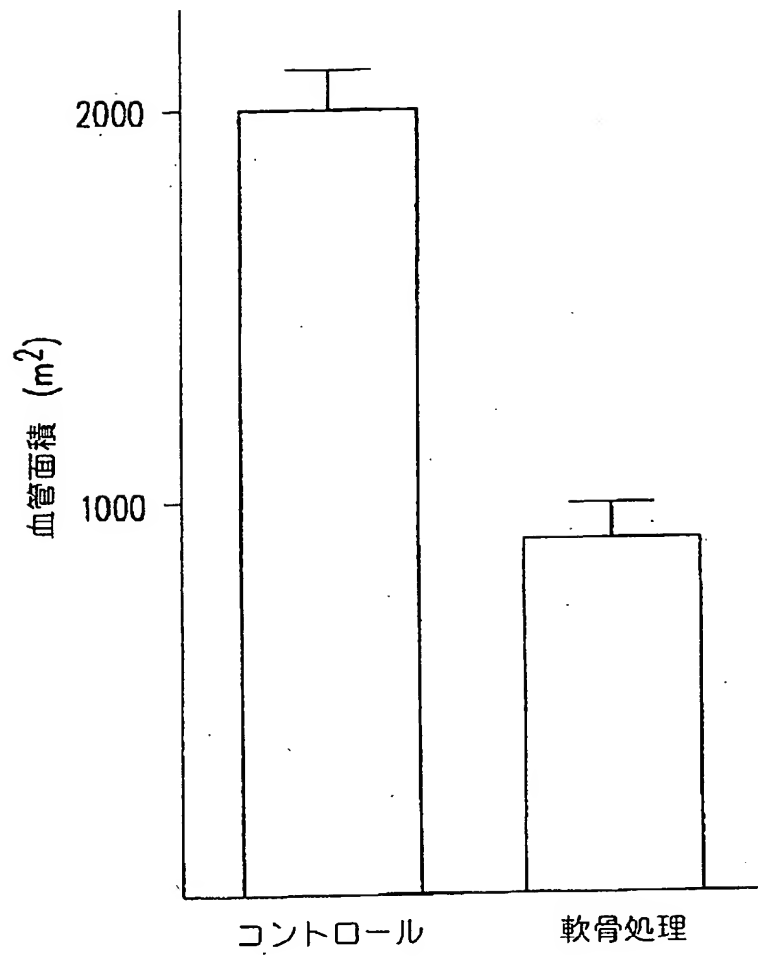
【図6】



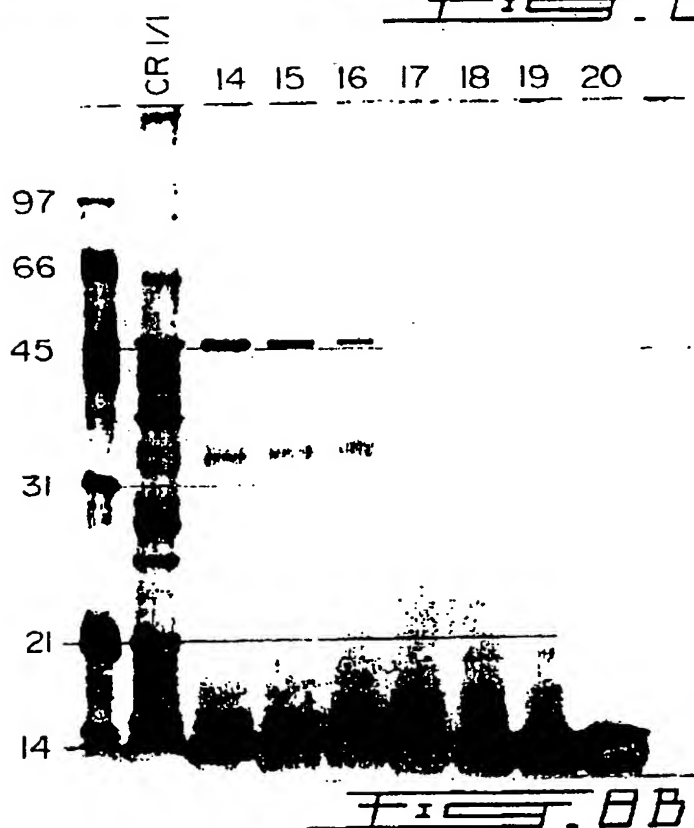
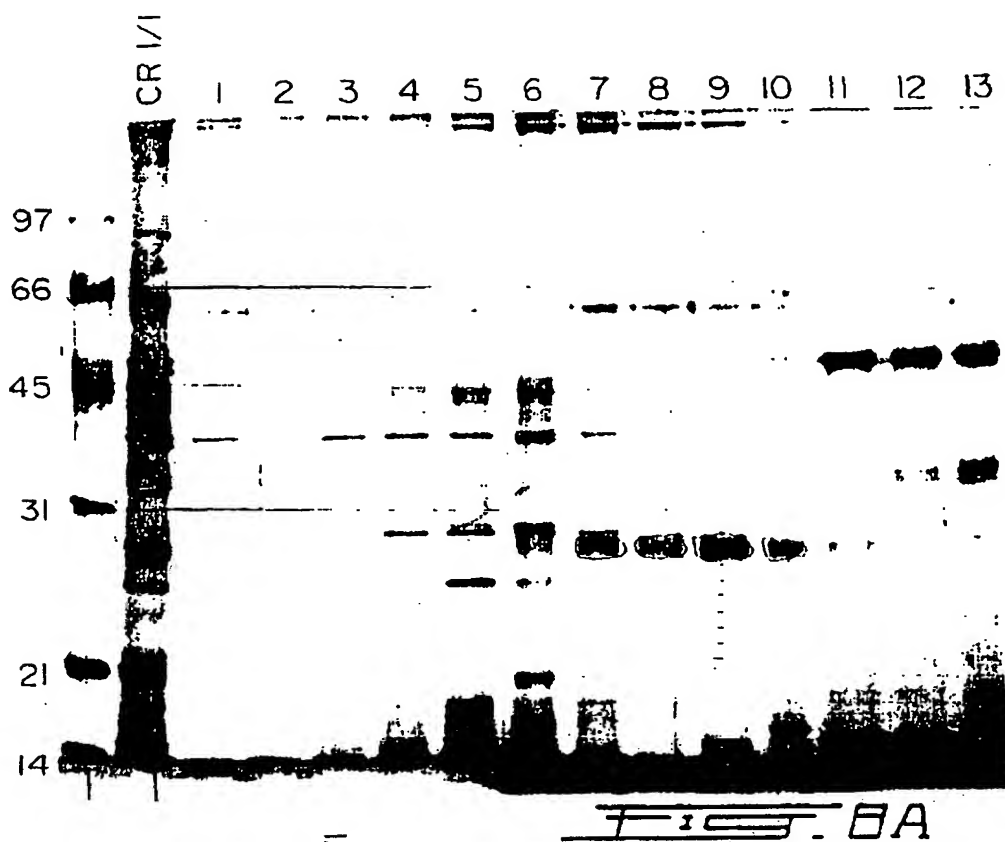
Figure 6b

処置ラット。DMBA誘導乳腫瘍。血管の数及びサイズの減少に基づき、主要組織変化があった（V）。これは一層コンパクトな組織の外観を供した。×120。

【図7】

Fig. 7

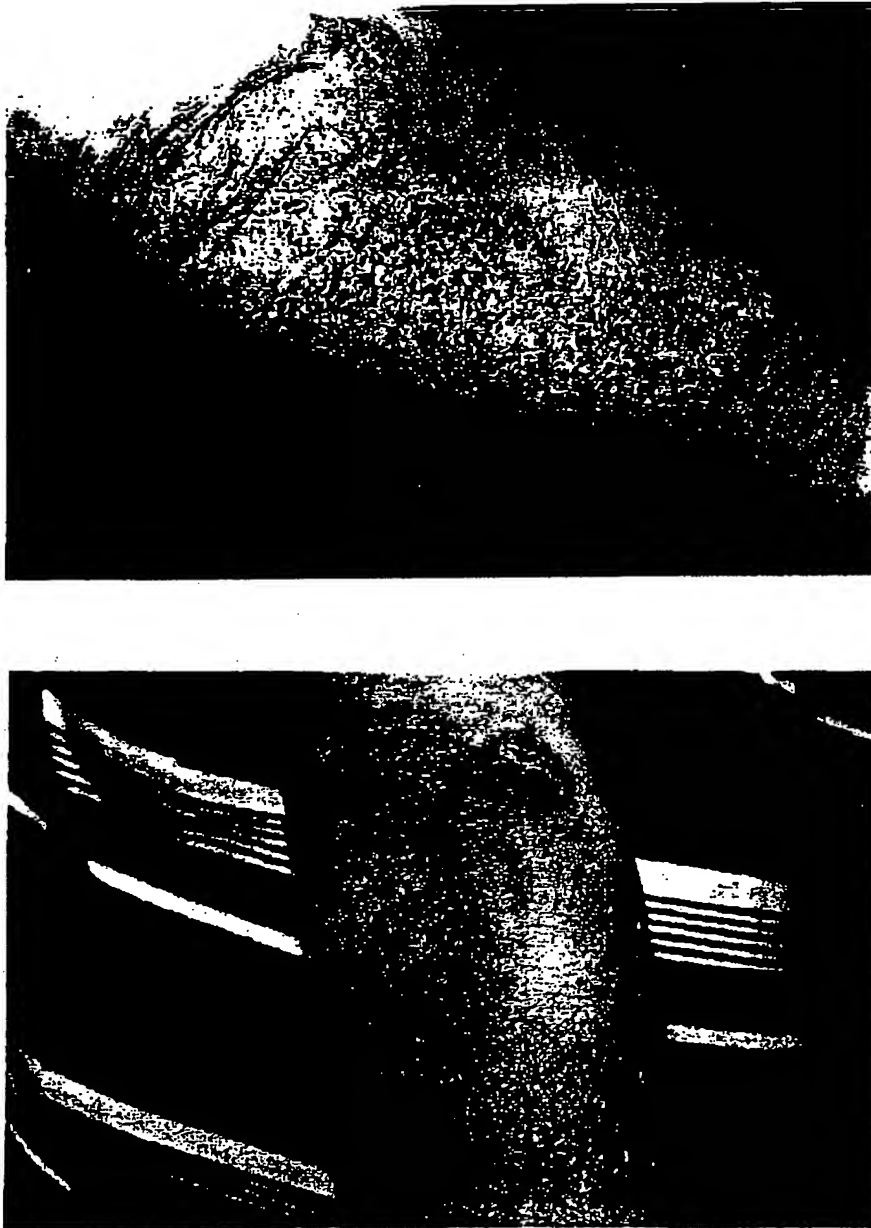
【图8】



BEST AVAILABLE COPY



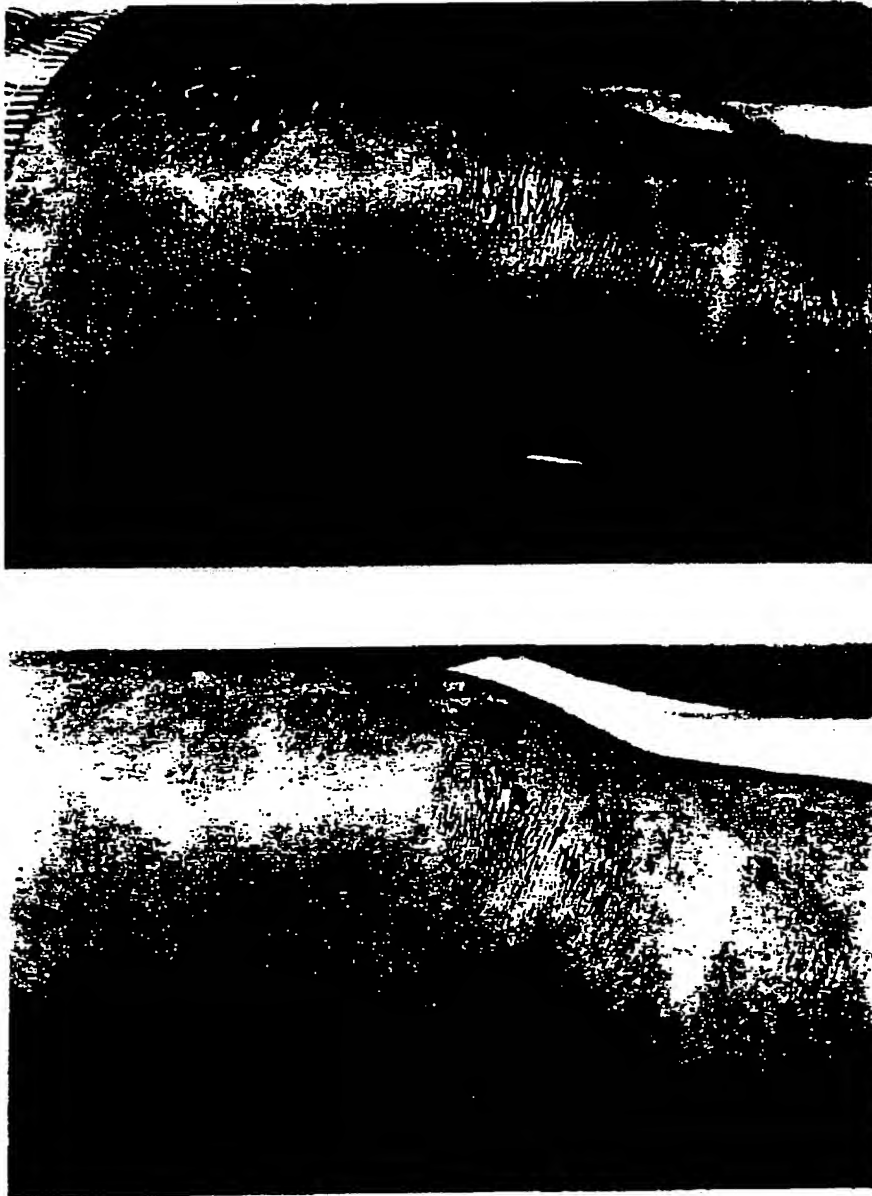
【図9】



**Figure 9 a)** 上版：処置前の角化症を伴う乾癬に苦しむ患者。  
下版：液体軟骨抽出物を含む製剤の1ヶ月の局所投与後。

BEST AVAILABLE COPY

【図9】



**Figure 9 b)** 上版：処置前の角化症を伴う乾癬に苦しむ患者。  
下版：液体軟骨抽出物を含む製剤の3ヶ月の局所投与後。

BEST AVAILABLE COPY

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/CA 95/00233

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A61K35/60		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANCER LETTERS, vol.51, 1990 pages 181 - 186 T. OIKAWA ET AL. 'A NOVEL ANGIOGENIC INHIBITOR DERIVED FROM JAPANESE SHARK CARTILAGE (I).' see the whole document ---	1,11
X	SCIENCE, vol.221, no.4616, 16 September 1983, LANCASTER, PA US pages 1185 - 1187 ANNE LEE ET AL. 'SHARK CARTILAGE CONTAINS INHIBITORS OF TUMOR ANGIOGENESIS' see the whole document --- -/-	1,11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>* Special categories of cited documents :</b> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 September 1995		Date of mailing of the international search report 19.09.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rempp, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/CA 95/00233

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FED. PROC., vol.45, no.4, 1986 page 949 C.A. LUER 'INHIBITORS OF ANGIOGENESIS FROM SHARK CARTILAGE' ABSTRACT 4624 ---	1,11
X	US,A,5 075 112 (IRWIN W. LANE) 24 December 1991 cited in the application see column 2, line 42 - line 68 ---	1,11
X,P	WO,A,95 03036 (ANGIOGENESIS TECHNOLOGIES INC.) 2 February 1995 see page 4, line 17 - page 6, line 23 see page 37; example 1 -----	1,11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 95/00233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5075112	24-12-91	NONE	
WO-A-9503036	02-02-95	AU-B- 7119294	20-02-95

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI
A 6 1 K 38/00		9051-4C	A 6 1 K 37/02
		9051-4C	37/22

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UZ, VN

(72) 発明者 ブラゾー, ポール  
 カナダ国, ケベック エイチ4ジェイ 9  
 ゼット7, モントリオール, オデット  
 オリニー, 12460

(72) 発明者 ジュノー, クリスティアン  
 カナダ国, ケベック ジー1エックス 3  
 ティー5, スターフォイ, ジングラス  
 トリート 787, アパートメント 203